

Instituto Malbrán (Ministerio de Salud Pública)  
Instituto de Fisiología (Facultad de Ciencias Médicas,  
Universidad de Buenos Aires)

## Inhibición, protección y reactivación de la L-ofi-aminoácido-oxidasa

por A. Barrio

(Recibido para publicar el día 15 de mayo de 1951)

En una comunicación anterior (2) señalamos que las variaciones en el contenido de riboflavina eran paralelas a la actividad de la L-ofi-aminoácido-oxidasa en los venenos de Crotalidae; este hecho nos hacía suponer y en concordancia con Zeller (10), la estructura flavínica de dicha enzima. Posteriormente Singer y Kearney (7, 8) demostraron que el grupo prostético de la L-ofi-aminoácido-oxidasa es el flavoadenin dinucleótido.

Zeller (9, 10, 11, 12) descubridor de esta actividad catalítica de los venenos ofídicos menciona la inhibición competitiva de algunos ácidos carboxílicos, yodoacético, aminosulfónicos, sulfónicos aromáticos, sulfonamidas, etc.

Habíamos notado que trabajando ajustándonos estrictamente a la técnica descrita por el autor antes citado los resultados del  $Q_{O_2}$  para una misma muestra de veneno eran totalmente inconstantes y menores; esto nos llevó a comprobar la acción inhibitoria del fosfato y la acción protectora de tal efecto ejercida por el substrato; estábamos haciendo las últimas comprobaciones cuando Kearney y Singer (6) publicaron una breve comunicación señalando esos hechos.

En el presente trabajo se confirman los datos de estos autores y se señalan otros hechos nuevos acerca de la inhibición, protección y reactivación de esta enzima.

### Material y métodos

Se utilizó el veneno de serpiente de cascabel *Crotalus terrificus terrificus* (Laur.) procedente de la provincia de Santiago del Estero (Argentina), y en algunos experimentos se usó la ponzoña de

*Bothrops alternata* (Dum. y Bibr.). Estos venenos fueron extraídos en el Instituto Malbrán de ofidios en cautiverio.

La actividad enzimática fué determinada mediante el consumo de  $O_2$  medido en microrespirómetros de Warburg. El sistema completo contenía: sustrato: 1-leucina 1 cc., 7 mM (concentración final) disuelta en buffer fosfato pH 7,2 (M/15) o buffer Veronal pH 7,2 (M/15); enzima: solución de veneno 2 cc. (0,5 mg. de veneno seco disueltos en los buffer anteriormente citados). Ciertas sustancias investigadas, metal, suero, etc., eran agregadas a la solución de veneno en tiempo y cantidades variables, según el caso, y que serán indicadas en cada experimento todos los metales se adicionaron en forma de cloruros. Las lecturas se hicieron cada 15 minutos, duración de los experimentos de 30 minutos a 1 hora después de un tiempo de equilibración de 7 minutos. En algunos casos se efectuó la mezcla enzima-sustrato luego de este lapso y en otros, el veneno fué incubado ya inicialmente en la leucina. El desprendimiento de  $CO_2$  era fijado por HONa. El  $SH_2$  o el aire se hacía burbujear lentamente en el líquido (solución de veneno) puesto en un tubo durante 15 minutos. Se trabajó a pH 7,2, a temperaturas desde  $20^\circ$  a  $40^\circ$  c. y se utilizó como atmósfera gaseosa el aire; los resultados se expresan en  $QO_2$  (microlitros de  $O_2$  por hora y por mg. de veneno seco).

## Resultados

### Acción del fosfato, borato y sustrato

1.º La actividad enzimática de los venenos de *Crotalus terrificus* y *Bothrops alternata* disminuye rápidamente cuando se incuba en presencia de buffer y fosfato y en menor proporción en presencia de buffer borato. Dicha inactivación se intensifica con el aumento térmico. En efecto, mientras que es prácticamente nula a  $20^\circ$  para los dos venenos citados, a  $38^\circ$  ó  $45^\circ$  el veneno de *Crotalus terrificus* sufre un descenso brusco en los primeros 10 a 15 minutos, decayendo luego lentamente su actividad y el de *Bothrops alternata* a las mismas temperaturas, experimenta también una gran caída aunque no tan brusca como el anterior (gráficos 1, 2 y tabla 1).

2.º Si los venenos son incubados desde un principio conjuntamente con el sustrato, aun en presencia de fosfato, no se observa pérdida de actividad, vale decir que la 1-leucina actúa como poderoso protector antes de que haya ejercido su acción inhibitoria el fosfato (tabla 1).

3.º El suero antiofídico (I. M.) el suero normal de caballo, el suero dializado o hidrolizado, el suero carbonizado, la goma arábica y otros coloides, ejercen también una acción protectora en medio fosfato, aunque no tan intensa como la 1-leucina.

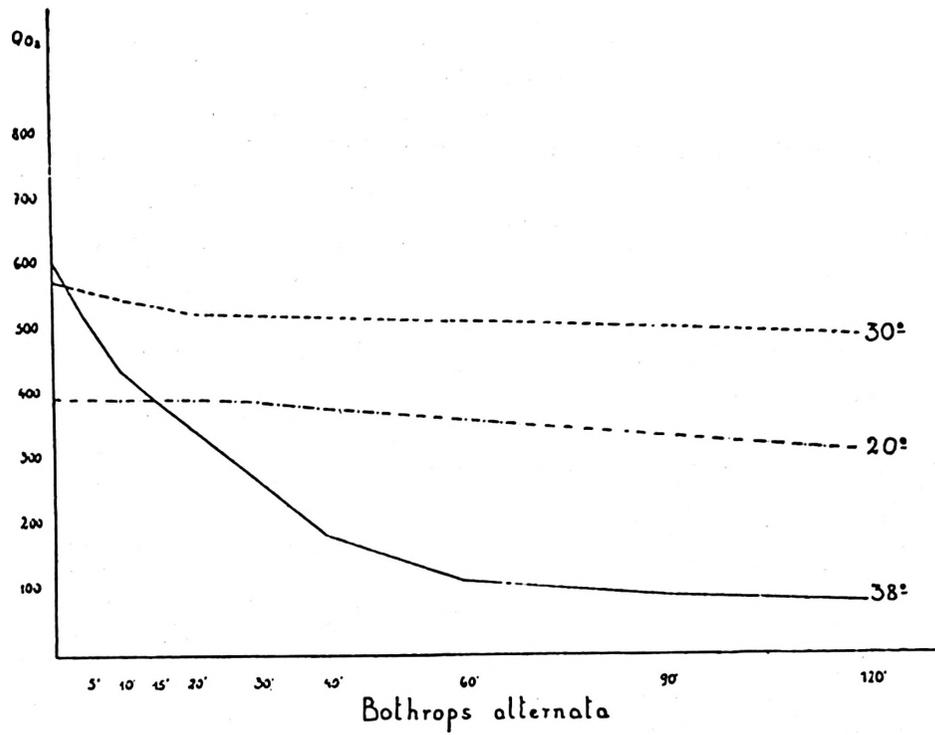


Fig. 1. — Actividad de la l-*of*-aminoácido-oxidasa de *B. alternata*, a pH 7,2 y a diferentes temperaturas. En las ordenadas se señalan los QO<sub>2</sub> y en las abscisas los diferentes tiempos de incubación del veneno en buffer fosfato M/15 antes de agregarle el sustrato.

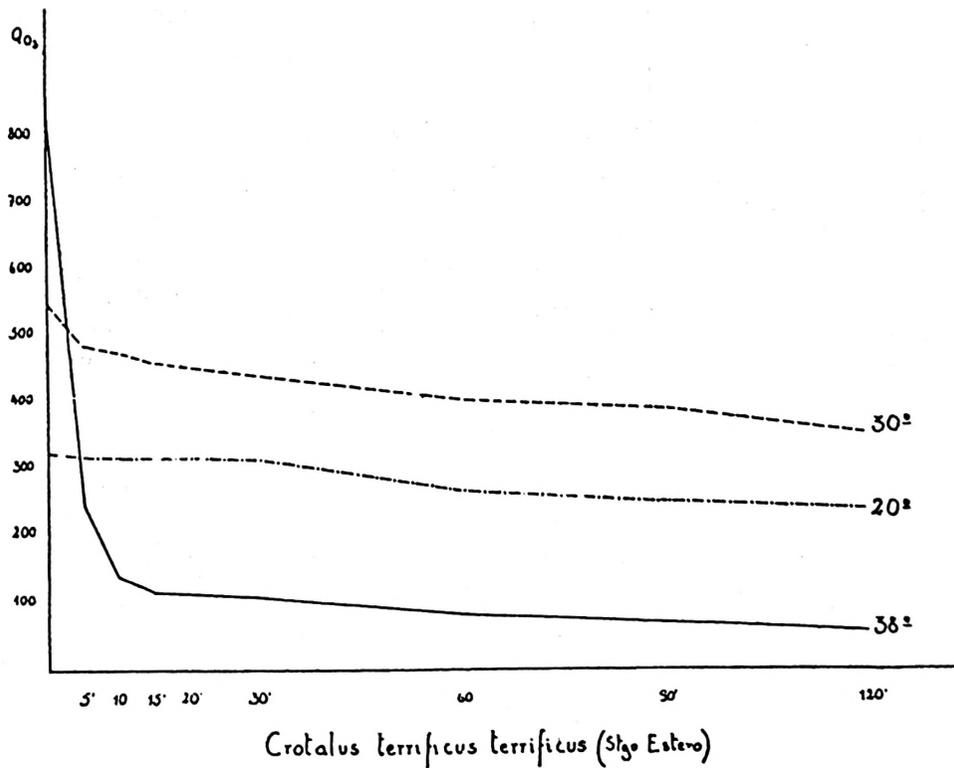


Fig. 2. — Igual al anterior pero con veneno de *Crotalus terrificus*

4.º Por el contrario, los venenos incubados aisladamente con buffer Veronal no pierden su actividad aun en ausencia del sustrato. Los  $QO_2$  alcanzados de esta manera son semejantes a los obtenidos mediante la acción protectora del sustrato en presencia de fosfato (tabla 1).

TABLA I

Actividad de la L-ofi-aminoacido-oxidasa de *crotalus terrificus* a pH 7,2 y a 38° C. en presencia de diversas sustancias protectoras e inhibidoras

Tiempo de incubación	Sustancias que se incubaron con el veneno antes de las mediciones			Q O <sub>2</sub> Buffer fosfato M/15	Q O <sub>2</sub> Buffer Veronal M/15
	l-leucina 7 mM conc. final	Suero normal 1 cc. *	Metales 1'5 mM conc. inicial 1 mM conc. final		
5'	—	—	—	240	780
20'	—	—	—	100	750
60'	—	—	—	25	730
5'	+	—	—	800	780
20'	+	—	—	780	760
60'	+	—	—	780	740
5'	—	+	—	600	—
20'	—	+	—	600	—
5'	—	—	+ Fe	600	10
20'	—	—	+ Fe	550	0
5'	—	—	+ Hg	10	10
20'	—	—	+ Hg	0	0
5'	—	—	+ Ag	10	10
20'	—	—	+ Ag	0	0
5'	—	—	+ Cu	110	10
20'	—	—	+ Cu	90	0

Las + señalan las sustancias empleadas.

\* Además se utilizó suero antiofídico, suero carbonizado, goma arábica etc., demostrando poseer actividad protectora similar.

#### Acción de metales

5.º El Cu (en concentraciones finales de 0,5 mM a 5 mM), el Hg (3 mM a 4,5 mM) y la Ag (3 mM a 4,5 mM) tanto en presencia de buffer fosfato o Veronal son altamente inhibidores (tabla 1).

El Fe (1,5 mM; 5 mM) actúa de manera distinta: en buffer

TABLA II

Reactivación y reinhibición de la L-ofi-aminoácido-oxidasa de *crotalus terrificus* a pH 7,2 y a 38° C.

Buffer Veronal M/15 Después de la incubación con Cu 5 mM, el veneno fué tratado por:					
Tiempo de incubación	Cisteína 8 mM.	SH <sub>2</sub> 1.ª vez	Aire	SH <sub>2</sub> 2.ª vez	Q O <sub>2</sub>
5'	+	—	—	—	50
20'	+	—	—	—	20
5'	—	+	—	—	650
20'	—	+	—	—	250
5'	—	+	+	—	50
20'	—	+	+	—	0
5'	—	+	+	+	1200
20'	—	+	+	+	1100
Idem pero incubado con Fe 5 mM					
20'	—	+	—	—	1000
20'	—	+	+	—	150
Idem pero incubado con Ag 3 mM					
20'	—	+	—	—	670
20'	—	+	+	—	250
Idem pero incubado con Hg 3 mM					
20'	—	+	—	—	650
20'	—	+	+	—	200
Buffer Fosfato M,15 Después de la incubación en fosfato, el veneno fué tratado por:					
Tiempo de incubación	Cisteína 8 mM	SH <sub>2</sub> 1.ª vez	Aire	SH <sub>2</sub> 2.ª vez	Q O <sub>2</sub>
5'	+	—	—	—	380
20'	+	—	—	—	150
60'	+	—	—	—	50
5'	—	+	—	—	700
20'	—	+	—	—	400
60'	—	+	—	—	150
20'	—	+	+	—	50
20'	—	+	+	+	800

Los + señalan las sustancias empleadas.

fosfato se comporta como protector y en Veronal como inhibidor (tabla 1).

6.° El sustrato puede proteger de la acción del Cu siempre que éste actúe en bajas concentraciones (0,5 mM), si la cantidad de Cu es mayor, el sustrato carece de poder protector (tabla 1)

La inactivación por estos metales es mayor cuanto mayor su concentración y mayor el tiempo de incubación con los venenos.

#### Reactivación

7.° Teniendo en cuenta la referencia de Zeller de que la l-ofi-aminoácido-oxidasa es inhibida por el ácido yodoacético y nuestras comprobaciones sobre la inactivación por metales pesados, supusimos que se tratara de una enzima con grupos SH activos; por lo tanto intentamos actuar sobre la apoenzima. La l-ofi-aminoácido-oxidasa inactivada por el fosfato o los metales anteriormente citados es reactivada grandemente por el burbujeo de  $\text{SH}_2$  y en menor proporción por el agregado de cisteína (8 mM) (tabla 2).

8.° La reactivación es mayor cuanto menor es el tiempo de acción del inhibidor; así con pocos minutos de incubación se logra una reactivación casi total, mientras que si pasan de los 60 minutos la inhibición es prácticamente irreversible.

9.° El burbujeo de aire sobre la mezcla (veneno + inhibidor) ya reactivada por  $\text{SH}_2$  la torna inactiva nuevamente pero si se la somete a la acción del  $\text{SH}_2$  por segunda vez se logra una nueva reactivación mucho mayor que la primera (y aun mayor que antes de ser inactivada la enzima). El burbujeo de aire sobre la solución de veneno primitiva carece de acción inhibidora.

#### Discusión

La acción inhibidora del fosfato y del borato observada por nosotros y la del fosfato y arseniato comprobada por Kearney y Singer, no es de fácil interpretación; es probable que se deba al bloqueo de los grupos activos de la enzima.

En cuanto a los metales su efecto es más conocido, pues es sabido que el Cu, Ag, Hg, etc., inhiben a una serie de enzimas al actuar sobre sus grupos sulfhídricos libres (1, 3, 4, 5, etc.).

La protección ejercida por el sustrato, el suero y los coloides, es del tipo de la observada en otras enzimas (ureasa, por ejemplo); al parecer impide ejercer su acción tóxica a los metales pesados sobre la enzima, y es probable que actúe de manera similar al proteger de la acción destructora del fosfato.

El efecto recuperador ejercido por la cisteína y el  $\text{SH}_2$  sobre la enzima inactivada por los metales (¿ y por el fosfato?) se debe al des-

bloqueo de los grupos tioles por precipitación de los cationes en forma de sulfuro (al burbujear el  $\text{SH}_2$  opacifica al líquido con un precipitado oscuro).

El paso del aire al oxidar a los grupos SH y solubilizar nuevamente a los cationes inactiva por segunda vez a la enzima. Es interesante destacar que el burbujeo del aire sobre el veneno primitivo carece de acción inhibitoria, es decir, que para que ese efecto se ponga de manifiesto es preciso haber inactivado y reactivado previamente a la enzima. Sería algo similar a lo señalado por Hellermann (4) referente a la inactivación enzimática por aireación en presencia de  $\text{Cu}^{++}$  o  $\text{Fe}^{++}$  y su reactivación posterior por corrientes de  $\text{SH}_2$ .

La segunda reactivación por  $\text{SH}_2$ , por la extraordinaria exaltación que provoca (valores superiores a los obtenidos con la enzima original), hace suponer que no solamente se logra por este procedimiento un desbloqueo de los grupos SH iniciales, sino que también se incorporan nuevos grupos tioles.

El conocimiento de que el fosfato con el Fe forman complejos estables con la consiguiente desaparición de su estado iónico explicaría la causa por la que el Fe actúa parcialmente como protector en presencia de buffer fosfato y como inhibidor frente al buffer Veronal.

Agradecemos al doctor Andrés O. M. Stoppani, profesor titular de Química Biológica de la Facultad de Ciencias Médicas de Buenos Aires, el interés y valiosas sugerencias prestadas para la realización de este trabajo.

### Resumen

1.° El "buffer" fosfato y en menor grado el borato inhiben la acción enzimática de los venenos de *Crotalus terrificus* y *Bothrops alternata*; dicha inhibición se acentúa con el aumento térmico.

2.° Los venenos incubados en presencia de "buffer" Veronal no son inhibidos.

3.° El Cu, Hg y Ag inactivan también a la l-ofi-aminoácido-oxidasa.

4.° El sustrato (l-leucina), el suero, etc., protegen de la acción inhibitoria del fosfato y de los metales.

5.° El Fe en presencia de fosfato se comporta como protector, y de Veronal como inhibidor.

6.° El burbujeo de  $\text{SH}_2$ , y en menor proporción el agregado de cisteína, reactivan a la l-ofi-aminoácido-oxidasa inactivada por el fosfato y los metales.

7.° El paso de aire sobre la mezcla (veneno + inhibidor) ya reactivada por  $\text{SH}_2$  la inactiva nuevamente, pero si se la somete por segunda vez a la acción del  $\text{SH}_2$  su actividad es exaltada a valores mayores que antes de ser inactivada por primera vez. El burbujeo de aire sobre la solución original de veneno no ejerce acción inhibitoria.

### Summary

1.° The phosphate buffer and, in a minor grade the borate inhibit the enzymatic properties of the *Crotalus terrificus* and *Bothrops alternata* poisons, this inhibition is accentuated at higher temperatures.

2.° The poisons incubated in the presence of Veronal buffer are not inhibited.

3.° The Cu, Hg and Ag inactive also the l-ophi-aminoacid-oxidase.

4.° The substract (l-leucine), the serum, etc., protect against the inhibitory action of the phosphate and of the metals.

5.° The Fe in the presence of the phosphate acts as protector, and of Veronal as inhibitor.

6.° The SH<sub>2</sub> bubbling, and, in a smaller proportion the aggregate of cysteine, reacts the l-ophi-aminoacid-oxidase inactivated by the phosphate and the metals.

7.° The passage of air over the mixture (poison + inhibitor) already reactivated by the SH<sub>2</sub> inactivates once again, but if subjected a second time to the action of the SH<sub>2</sub> its activity is exalted to higher values than those after inactivation for the first time. The air bubbling over the original poison solution does not exert an inhibitory action.

### Bibliografía

- (1) ANDERSON, B.: *Hoppe Scyl. Z.*, 242, 205. 1936.
- (2) BARRIO, A.: *Rev. Inst. Malbrán* (en prensa). 1950.
- (3) HELLERMANN, L.: *Physiol. Rev.* 17, 454. 1937.
- (4) HELLERMANN, L., PERKINS, M. E. y CLARK, W. M.: *Proc. Nat. Acad. Sci.* 19, 855. 1933.
- (5) HOPKINS, F. C., MORGAN, E. J., y LUTWAK-MANN, C.: *Bioch. J.* 32, 1829, 1938.
- (6) KEARNEY, E. B., y SINGER, T. P.: *Arch. Bioch.* 21, 242. 1949.
- (7) SINGER, T. P., y KEARNEY, E. B.: *Arch. Bioch.* 27, 348. 1950.
- (8) SINGER, T. P., y KEARNEY, E. B.: *Arch. Bioch.* 29, 190. 1950.
- (9) ZELLER, E. A.: *Helv. Physiol. Pharmacol. Acta*, 2 33C., 1944.
- (10) ZELLER, E. A.: *Adv. Enzymol.* 8, 459. 1948.
- (11) ZELLER, E. A., y MARITZ, A.: *Helv. Chim. Acta*, 27, 1888. 1944.
- (12) ZELLER, E. A., y MARITZ, A.: *Helv. Chim. Acta*, 28, 365. 1945.